

ARTÍCULOS PRINCIPALES

TRAS LA PISTA DE LAS HUELLAS GENÉTICAS HUMANAS

Ph.D. PEDRO LEÓN*
Bach. EUGENIA ROJAS*

REFERENCE: LEÓN, P. and ROJAS, E., *Behind the clue of human genetic fingerprint*, *Medicina Legal de Costa Rica*, 1991, vol. 8, Nº 1, pp. 3-6.

ABSTRACT: The determination of the "genetic fingerprint" consists in the analysis of genetic material, DNA, present in all biological samples.

By using the proteins obtained from bacteria, which are known as restrictive enzymes, it is possible to cut DNA according to its sequences of nucleotides. They are separated by electrophoresis and transferred to nitrocellulose. It is a hybrid with a probe (complimentary sequences of nucleotides). A pattern of fragments is produced, which appears as bands of different motility. The pattern of bands defines the genetic fingerprint of every person. So it is possible to identify an individual as mother or father in paternity investigation or as author of rape or homicide.

KEYWORDS: Genetic fingerprint, genetics, paternity, identification, molecular biology, legal medicine.

REFERENCIA: LEÓN, P. y ROJAS, E., *Tras la pista de las huellas genéticas humanas*, *Medicina Legal de Costa Rica*, 1991, vol. 8, Nº 1, pp. 3-6.

RESUMEN: La determinación de las "huellas genéticas" consiste en el análisis del material genético, ADN, presente en todas las muestras biológicas. Por medio de proteínas obtenidas de bacterias, proteínas que se conocen como *enzimas de restricción*, es posible cortar el ADN según su secuencia de nucleótidos. Luego se separa por electroforesis y se transfiere a nitrocelulosa. Se hibrida con una sonda (secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia y marcada inmunológica o radiactivamente). La unión de esta sonda a las secuencias produce un patrón de fragmentos de diferente tamaño, los cuales aparecen como bandas, de movilidad diversa. El patrón de bandas define las huellas genéticas de cada persona. Así se puede identificar a un individuo como madre en investigación de paternidad o como autor de una violación o un homicidio, donde dejó material biológico útil para este tipo de estudio.

PALABRAS CLAVES: Huellas genéticas humanas, genética, paternidad, identificación, biología molecular, Medicina Legal.

Nunca se imaginó el legendario detective Sherlock Holmes, ni su curioso amigo Watson, que algún día podría identificarse a un criminal con una mancha de sangre o un cabello dejado en el escenario de un crimen, por un método bioquímico relativamente simple y directo, que ha sido ya usado en varios países para llevar a violadores y otros criminales a juicio.

A mediados de los años 70's el desarrollo de diferentes técnicas moleculares llevaron a la revolución de la genética humana, y fue así como procedimientos como electroforesis en agarosa (recuadro 1) y transferencia a nitrocelulosa (recuadro 2), ambos acoplados al uso de enzimas de restricción, constituyeron una poderosa herramienta biotec-

nológica con diferentes aplicaciones de Medicina Legal como lo son las pruebas de paternidad y los casos forenses resueltos por medio de las huellas genéticas.

En 1980, Botstein et al., mostraron que los fragmentos polimórficos de res-

1. ELECTROFORESIS

Método en el cual un campo eléctrico es utilizado para mover los fragmentos de ácidos nucleicos a través de poros en un gel de agarosa; los fragmentos más pequeños se mueven más rápidamente que los más grandes. Puede calcularse así el peso molecular de muchas muestras a la vez.

2. TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA

El gel es colocado debajo de una membrana de nitrocelulosa y se deja correr un flujo de "buffer" a través del gel hacia la membrana. Este flujo hace que los fragmentos de ADN salgan del gel y sean transferidos a la nitrocelulosa donde se unen, creando así, la réplica del gel.

tricción o RFLP's pueden ser utilizados en estudios de ligamiento de enfermedades humanas, contribuyendo al avance del diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades. Los RFLP's son la base de

las huellas genéticas que ahora han sido descubiertas.

Los RFLP's se originan cuando un cambio (o mutación) en una base del ADN altera un sitio de corte para una enzima de restricción determinada, ya sea creándolo o eliminándolo, por lo tanto el patrón de corte de la enzima cambia y puede producir un fragmento largo en vez de dos fragmentos pequeños, o vice-versa.

Estas alteraciones que se producen a través del genoma son heredadas de acuerdo con las leyes de Mendel (ver Fig. 1).

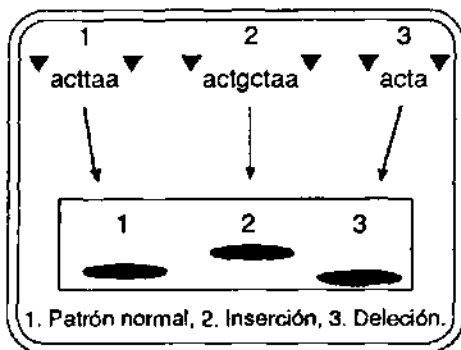


Fig. 1. Cambio de corte por alteración de una secuencia.

Para aplicaciones forenses los RFLP's más importantes son los que están asociados con una secuencia de repeticiones en *tandem*, variables en número, de los cuales existen varios tipos en cada cromosoma.

Para efectuar la determinación de huellas genéticas el ADN es digerido con enzimas de restricción y separado por electroforesis y transferido a nitrocelulosa. Luego la nitrocelulosa con el ADN se hibrida con una sonda, que es una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia y que está marcada ya sea inmunológica o radiactivamente. La unión de esta sonda a las secuencias produce un patrón de fragmentos de diferentes tamaños los cuales aparecen como bandas de diferente movilidad (Fig. 2).

Este patrón es altamente variable o polimórfico de un individuo a otro (excepto para gemelos idénticos) pero conservado en diferentes tejidos del mismo individuo. Esta combinación de variabilidad entre individuos y estabilidad dentro de un individuo, sugiere que estos patrones de fragmentos de diferentes tamaños

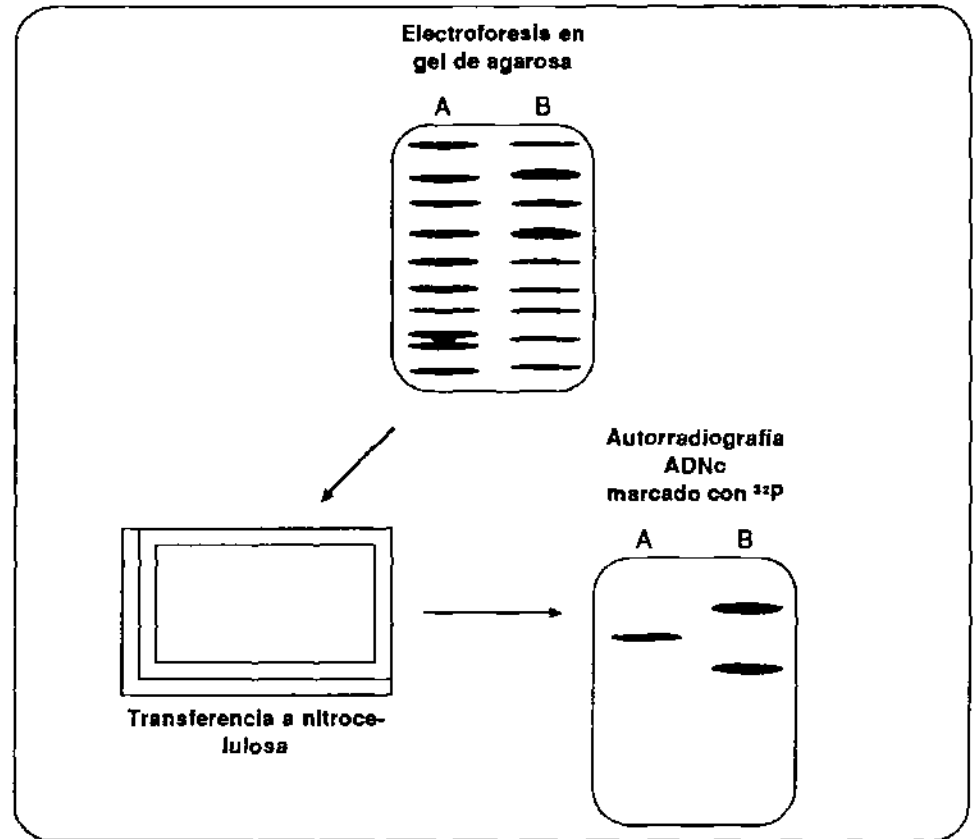


Fig. 2. Transferencia Southern. El ADN cortado con enzimas de restricción es separado por electroforesis en un gel de agarosa, luego los fragmentos de ADN son transferidos a nitrocelulosa, donde se lleva a cabo la hibridación con la sonda marcada en este caso con ³²P. Los fragmentos específicos que hibridaron son detectados en la autorradiografía.

cortados con las mismas enzimas de restricción y detectados con sondas específicas sirven como marcadores individuales o huellas genéticas.

El procedimiento de determinación de las "huellas genéticas" se ha convertido rápidamente en evidencia aceptable para las cortes de justicia de varios países desarrollados, incluyendo Estados Unidos e Inglaterra, en juicios de paternidad y en casos de asalto, violación, etc. La prueba consiste en el análisis del material genético, el ADN, presente en cualquier muestra biológica que se logre obtener. En casos de paternidad dudosa, el método es particularmente poderoso, pues generalmente se cuenta con cantidades suficientes de sangre fresca, para obtener buena cantidad de ADN y así detectar señales claras y fuertes, en el patrón de bandas que definen la huella genética de cada persona. Cada análisis llega a producir un patrón de 5 a 10 bandas en diversas posiciones, como lo muestra la Fig. 3. La variación es tan grande en los seres humanos que todos somos diferentes, y si una sonda no genera variación, basta aplicar otra a la

misma preparación, hasta detectar diferencias.

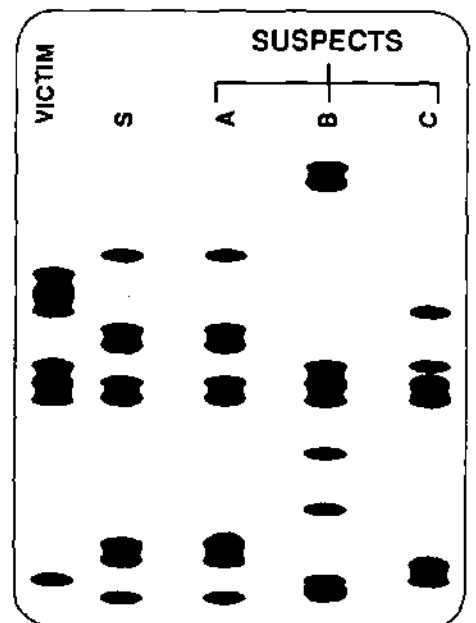


Fig. 3. Patrón de bandas de diferentes individuos, donde se verifica la culpabilidad del sospechoso A. Victim: Víctima; S: Sujeto culpable; A, B y C: Sospechosos (suspects).

Para entender en detalle cómo se efectúa esta prueba es necesario recordar los siguientes hechos:

1. Cada ser humano lleva dos juegos completos de cromosomas, portadores de los genes. Todas las células del cuerpo contienen en el núcleo 23 pares de cromosomas, 46 en total. Cada padre contribuye 23 cromosomas al cigoto (embrión), los cuales son segregados al azar, durante la meiosis al formarse los gametos. Consecuentemente aún los hermanos en una familia, heredan juegos diferentes de cromosomas, que dan origen a diferentes patrones de RFLP's.

2. El ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de los cromosomas contiene los genes (que generalmente codifican por las proteínas), junto con gran cantidad de ADN no codificante cuya función no se entiende bien aún, y que es la principal fuente de variabilidad para producir el patrón de bandas que define la huella genética.

Para efectuar la prueba, por lo tanto, es necesario purificar el ADN, separándolo de otros componentes del núcleo.

Brevemente en la estructura del ADN cuatro bases nitrogenadas con millones de unidades, se asocian formando una doble hélice. Cada mitad de la hélice es complementaria con la otra, a través de puentes de hidrógeno débiles que siguen la regla A=T y C=G (ver Fig. 4).

Los genes son, en general, segmentos del ADN que se copian para dirigir la

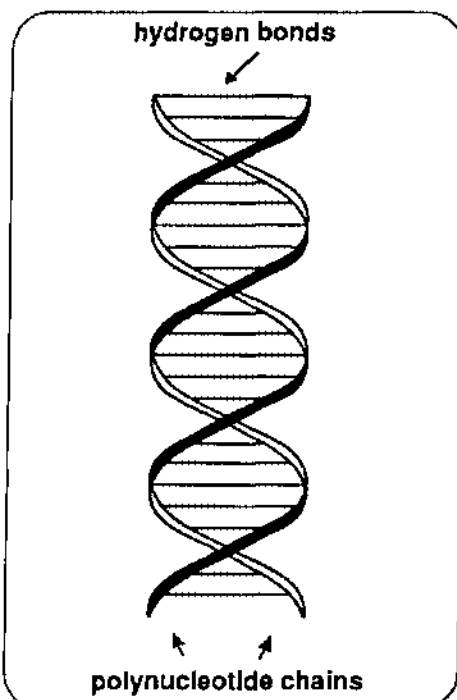


Fig. 4. Apareamiento de las bases en las dos cadenas del ADN formando una doble hélice.

construcción de las proteínas. La síntesis proteica ocurre en el ribosoma (citoplasma), a través del proceso de traducción genética.

3. Recientemente se han descubierto ciertas proteínas que cortan el ADN de manera precisa, según su secuencia de nucleótidos, y que como tijeras moleculares, permiten cortar y pegar secuencias con los métodos de la ingeniería genética. Estas proteínas, obtenidas de bacterias, reconocen diferentes secuencias entre cuatro y siete pares de nucleótidos. Estas proteínas llamadas *enzimas de restricción*, se pueden adquirir fácilmente hoy día, en muchas compañías farmacéuticas (ver Fig. 5).

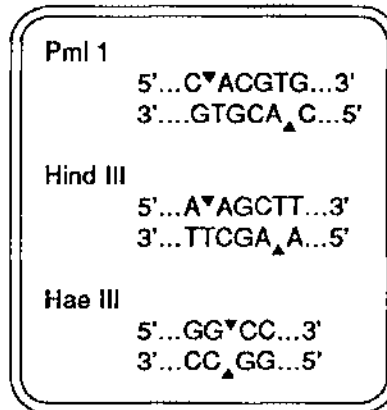


Fig. 5. Patrón de corte de algunas enzimas de restricción.

4. Los fragmentos que se generan por la digestión del ADN en cada muestra, se separarán según su tamaño en un campo eléctrico, por la técnica de electroforesis en agarosa, antes mencionada.

Luego que el ADN se ha separado, se analiza con "sondas" radiactivas (o marcadas inmunológicamente), para localizar secuencias complementarias.

Las secuencias complementarias pegan la sonda y luego son detectadas sobre película de rayos X (usada en radiología), por varias horas o días.

La sonda debe localizar por lo menos dos secuencias: la materna y la paterna, si los genes son diferentes (polimórficos) (ver Fig. 2).

5. Existen diferentes tipos de "sondas". Algunas localizan solo bandas de tamaño constante, otras localizan regiones polimórficas (variabilidad en la población de 10% o menos), y finalmente otras localizan regiones hipervariables (variabilidad más de 10%) que son las más importantes en la aplicación forense de esta técnica. En esta categoría están los

"VNTRs", (variable number tandem repeats), que detectan secuencias hipervariables en un solo cromosoma. Otras sondas pueden simultáneamente detectar variabilidad en varios cromosomas a la vez, produciendo muchas bandas.

La prueba pierde confiabilidad con muestras muy pequeñas o muy viejas. Consecuentemente es importante congelar rápidamente en hielo seco o nitrógeno líquido y luego guardar a -20 C (o preferiblemente a -70 C) cualquier muestra biológica (mancha de sangre, frotis vaginal, pelo).

Las muestras pequeñas aportan resultados a veces inciertos, y en aplicaciones criminales, cuando no existen archivos o fichas de comparación como sí es el caso de las huellas digitales, su valor es limitado.

Así, al menos en un juicio penal la prueba ha sido cuestionada recientemente, y la compañía que la efectuó por contrato sufrió un serio revés. Por lo tanto, es de gran importancia mantener fuertes controles de calidad y cautela al aplicar estas pruebas, introduciendo en lo posible, corroboraciones independientes con "dobles ciegos". En la mayoría de los casos la prueba es contundentemente clara y no solo excluyente, como las pruebas inmunológicas tradicionales. Lógicamente, cuando existen sospechosos, su patrón de huellas puede compararse al dejado en el sitio del delito, y así excluir o identificar positivamente al delincuente (ver Fig. 3).

Presumiblemente llegará el día en que, tal como existen para las huellas dactilares existirán bancos de huellas genéticas para individuos fichados por la ley. Así como las huellas dactilares han hecho un gran aporte al esclarecimiento del crimen, las huellas genéticas también tienen un gran potencial.

Nuestros esfuerzos en el CIBCM de la Universidad de Costa Rica, han ido dirigidos a la aplicación de esta metodología usando sondas no radiactivas, y clonando secuencias hipervariables en vehículos bacterianos de fácil manejo. Esto nos permitirá contar con una genoteca propia en Costa Rica que no dependa de onerosos derechos de patente.

Igualmente el CIBCM estaría en condiciones de producir sondas marcadas para la investigación básica y para la medicina forense. Se logra así cumplir dos de los objetivos fundamentales de la Universidad de Costa Rica, la investigación y la acción social, en este caso

dando apoyo a las entidades gubernamentales encargadas de dilucidar la identidad de individuos llevados a juicio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

<p>1. Sharp, P.A., Sudgen, B. and Sambrook, J. 1973. <i>Biochemistry</i> 12, 3055-3062.</p>	<p>2. Southern, E.M., 1975. <i>J. Mol. Biol.</i> 98, 503-517.</p> <p>3. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P., 1977. <i>J. Mol. Biol.</i> 113, 237-251.</p> <p>4. Botstein, D., White, R.L. Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980. <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 32, 314-331.</p>	<p>5. Jeffreys, A., Wilson, V. and Lay Thein, S., 1985. <i>Nature</i> 314, 67-73.</p> <p>6. Weber, J. and May, P., 1989. <i>Am J. Hum. Genet.</i> 44, 388-396.</p> <p>7. Jeffreys, A., Wilson, V., Newmann, R. and Keyte, J., 1988. <i>Nucleic Acids Research</i> 16, 10953-10971.</p>
---	--	--

CRITERIOS PSIQUIÁTRICO-FORENSES ACERCA DE LA GUARDACRIANZA

DR. JULIO ARBOLEDA-FLÓREZ*

<p>REFERENCE: ARBOLEDA-FLÓREZ, J., <i>Forensic psychiatry criteria on custody of children</i>, <i>Medicina Legal de Costa Rica</i>, 1991, vol. 8, Nº 1, pp. 6-8.</p> <p>ABSTRACT: In divorce or separation suits, the judge often asks the psychiatrist who is the fit parent for custody of the children. This means to define if the parent has mental, emotional and physical competence to be in charge of the children.</p> <p>When parents are "normal", it is convenient to follow the principle of "the best interest for the child", established by the judge Cardozo in 1924. In a such case the expert should take into account:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Both parents have equal rights. b) Type of prejudicial behaviors to the child. c) The wishes of the parents and the child. d) The parent who obtains the custody must guarantee the social and emotional welfare of the child. <p>As "special group of parent it is mentioned mental retards, mental patients, homosexuals and transsexuals. In a such cases psychiatrist must consider:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Emotional liaisons between the child and one of his parents. b) Fitness of one of the parents to provide love and education to the child, and also care, food and clothing. c) Stability of the environment where the child is going to live. d) Behavior of the child at home, in the school and in the neighborhood. e) Reasonable preference of the child toward one of his parents. <p>KEYWORDS: Custody of children, forensic, psychiatry, divorce.</p>	<p>REFERENCIA: ARBOLEDA-FLÓREZ, J., <i>Criterios Psiquiátrico-Forenses acerca de la guardacrianza</i>, <i>Medicina Legal de Costa Rica</i>, 1991, vol. 8, Nº 1, pp. 6-8.</p> <p>RESUMEN: En juicios de divorcio o separación, el tribunal suele preguntar al psiquiatra a cuál de los padres se puede confiar la guardacrianza de los hijos. Esto implica definir si la pareja tiene la capacidad mental, emocional o física para encargarse de sus hijos o si el Estado debe tomar medidas de adopción.</p> <p>Con padres "normales" conviene seguir el principio de "cuál es el mejor interés del niño", enunciado por el juez Cardozo en 1924. Para ello el perito debe tener en cuenta:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Ambos padres tienen igual derecho. b) Tipos de conducta claramente perjudiciales para el niño. c) Los deseos de los padres y del menor. d) El padre que tiene la custodia debe garantizar el bienestar social y emocional del niño. <p>Como grupos "especiales" de padres se citan los retardados mentales, los enfermos mentales, los homosexuales y los transexuales. En este caso el psiquiatra debe considerar, además, aspectos como:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Lazos emocionales entre el niño y uno de los padres. b) Habilidad y disposición de una de las partes para proveer cariño y educación al niño, así como cuidado, alimentación y vestido. c) Estabilidad del ambiente donde el niño va a vivir. d) Desempeño del niño en el hogar, la escuela, y el vecindario. e) Preferencia razonable del niño por uno de sus padres. <p>PALABRAS CLAVES: Custodia de menores, psiquiatría forense, divorcio.</p>
---	---

TEMAS GENERALES.

Los problemas que presenta la custodia de los menores de edad hacen parte de la mirada de problemas incluidos en las regulaciones de la Ley Civil (es decir aquella que regula las transacciones entre individuos) y más específicamente de las leyes que regulan la vida familiar o doméstica. Con frecuencia se le pide al psiquiatra o psicólogo forense

que haga una peritación acerca de a cuál de los dos padres debiera la Corte otorgar la guardacrianza en casos de divorcio o separación.

Antes de pasar revista de los aspectos psiquiátrico-legales específicos de los problemas de la guardacrianza es necesario recordar que a menudo éstos se correlacionan con preguntas acerca de la capacidad mental y emocional de repro-

ducirse. Esta capacidad tiene dos posibilidades si se le ve desde un punto de vista negativo o positivo.

Desde el punto de vista negativo las posibilidades dependen de si un individuo en particular, o una pareja, tiene el derecho de reproducirse, o si ese derecho se debe retirar debido a que la pareja sufre de ciertas incapacidades que puedan afectar al embrión o que no per-

* Julio Arboleda-Flórez, MD. Professor and Director, Division of Forensic Psychiatry, University of Calgary. Director, Dept. of Psychiatry, Calgary General Hospital. Fax: (403) 269-9201. JD Arboleda @ UNCAMULT.